

ラット小腸平滑筋における Phosphatidylethanolamine の 水 解 に 関 す る 研 究

西 村 護

札幌医科大学外科学第一講座 (主任 早坂教授)

札幌医科大学学生化学第二講座 (指導 坂上教授)

Studies on Hydrolysis of Phosphatidylethanolamine in Rat Small Intestinal Smooth Muscle

Mamoru NISHIMURA

*Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Hayasaka)*

*Department of Biochemistry (Section 2), Sapporo Medical College
(Directed by Prof. T. Sakagami)*

Summary

Studies on enzymatic hydrolysis of phosphatidylethanolamine in rat small intestinal smooth muscle were carried out in comparison with that in the small intestinal mucosa. The hydrolytic activity was measured by incubation in 0.1 M Tris-maleate buffer solution containing 700×g homogenate of the tissue as the enzyme source and ³²P-phosphatidylethanolamine isolated from rat small intestine as the substrate.

Occurrence of hydrolytic activity of phosphatidylethanolamine was clearly demonstrated in the small intestinal smooth muscle as well as in the mucosa, although the activity of the former was as low as 45% of that of the latter.

Then the additional investigations were followed.

Optimum pH was found to be at 7.2.

The results obtained by preincubation at different temperatures showed that the enzyme(s) related to the hydrolysis of phosphatidylethanolamine were heat-labile and the hydrolytic activity on the lysocompounds was more sensitive to the increase of temperature than that of the release of fatty acid from the original phospholipids.

An addition of deoxycholate resulted in lowering of the hydrolytic activity.

An addition of Ca⁺⁺ accelerated the hydrolysis markedly, while the effect of Mg⁺⁺ on the hydrolysis was slight.

In comparison to the hydrolysis in three types of phosphatidylethanolamine, namely diacyl-, alkenyl-acyl- and alkyl-acyl-type, the hydrolysis of diacyl-type was more significant than that of the latter two types. The extent of the hydrolysis between alkenyl-acyl and alkyl-acyl-type was almost similar.

緒 言

小腸粘膜のリン脂質の水解酵素については比較的早くより研究されており phospholipase A, phospholipase B, lysophospholipase の存在が報告されている^{1~8)}。一方小腸平滑筋のリン脂質の水解についての報文は少なくわずかに工藤⁹⁾、井村¹⁰⁾のリン脂質の水解酵素の存在を示唆する報告があるに過ぎなかった。最近、近藤¹¹⁾は lecithin および lysolecithin を基質として *in vitro* で小腸平滑筋の phospholipase について詳細に研究を行った。しかし

phosphatidylethanolamine の水解については未だ詳細な検討が行われていない。

小腸平滑筋の phosphatidylethanolamine は化学的には diacyl-, alkyl-acyl-, および alkenyl-acyl- 型の三つよりなり^{10,12)}、したがって水解様式もほとんど diacyl- 型よりなる lecithin より複雑であろうことが想定され関連酵素も lecithin 水解酵素より多様であると考えられる。

著者は小腸平滑筋のリン脂質代謝研究の一環としてこの問題を解明すべくラット小腸平滑筋のホモジネートを酵素材料とし、ラット小腸から調整した ³²P-phosphatidyletha-

anolamine を基質として小腸平滑筋層の水解酵素の存在を明らかにしさらに種々の条件を負荷してそれらの酵素活性に対する影響を検討した。

同時に粘膜層についても同様の実験を行ない、比較検討した。

また小腸両層ホモジネートと ^{32}P -phosphatidylethanolamine をそれぞれインキュベートした後、未水解の ^{32}P -phosphatidylethanolamine を緩やかな酸およびアルカリで水解することにより、diacyl, alkyl-acyl, alkenyl-acyl 型の三者に分けそれぞれの分解を比較検討した。

以上の実験結果より小腸平滑筋のリン脂質代謝について考察を試みた。

実験材料および方法

1. 実験材料

Silica gel H および Silica gel G は Merck 社から、Silicic acid (100 Mesh) は Mallinckrodt 社から入手した。放射性無機リン酸 (^{32}P i) は日本放射性同位元素協会より入手した。他の試薬および有機溶媒はすべて特級を用いた。

2. 酵素材料の調整

Wistar 系ラット (雌, 体重 170~200 g) を 18 時間絶食後、軽いエーテル麻酔下で開腹し、門脈を切断した後、心より約 100 ml の氷冷生理的食塩水を注入して小腸を灌流し、次いで幽門輪直後から回腸末端までを可及的に腸間膜の付着しないように摘出した。摘出した小腸は適当な長さに等分し、氷冷生理的食塩水で内腔を十分に洗浄した。その後小腸を翻転し、氷冷のガラス板上で片刃のカミソリの鈍な一端を用いて粘膜下層より粘膜を剥離して粘膜層とした。またこの際残った粘膜下層より漿膜におよぶ層を平滑筋層とした。小腸両層にそれぞれ 0.25 M Sucrose 液を加え、Potter Elvehjem ホモジナイザーにより 20~30% ホモジネートを作製した。

このホモジネートを 700×g, 20 分間遠沈して核、血球、未破碎細胞などを除き、上清画分を酵素材料とした。以上の操作は 0~4°C で行なった。酵素材料は -20°C で保存した。以上の様に保存した酵素材料は 3 カ月間はそのタンパク質量、水解活性に著明な変化はみられなかった。

3. 基質の調整

ラットの腹腔内に ^{32}P -リン酸塩 5 mCi 注入し 22~24 時間後、軽いエーテル麻酔下で開腹し小腸を剔出した。次いで剔出した小腸を 0~4°C で細切し、20 倍量のクロロホルム:メタノール (2:1 v/v) を加え室温にて一夜放置して小腸から脂質を抽出し、えられた抽出液は Folch 法¹³⁾ により精製した。さらに窒素気流下で減圧乾固し残渣をクロロホルムで一定量とした。

これらの脂質画分よりカラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー (TLC) により次のような操作で phosphatidylethanolamine を分離した。Silicic acid を充てんしたカラムに前述のクロロホルム液を加え、次いでクロロホルムおよび、クロロホルム:メタノール (3:7 v/v) で順次溶出した。クロロホルム—メタノール溶出液を窒素気流下で減圧乾固し、残渣をクロロホルムに溶解し一定量とした。

この液を用いて 110°C, 2 時間活性化し 1 mM 炭酸ソーダ液で調整した Silica gel H プレート (0.5 mm) 上でクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (100:60:14:4 by vol.) で 20°C 70 分間展開した。0.02% 2,7-ジクロロフルオレスセンのエタノール溶液を噴霧し、蛍光下で各脂質を識別し、phosphatidylethanolamine 画分をプレートよりかき出し、3 ml のクロロホルム:メタノール:酢酸:水 (50:39:1:10 by vol.) の混合液で室温にて 4 回抽出し、抽出液を 4 ml の 4 M アンモニア溶液で洗浄して 2,7-ジクロロフルオレスセンを除いた。さらに 4 ml の 50% メタノールを加えて洗浄し、えられたクロロホルム層を窒素気流下で減圧乾固し、適当量のクロロホルム溶液とした。

えられた ^{32}P -phosphatidylethanolamine 画分をさらに再 TLC を行なった。

110°C, 2 時間活性化し蒸留水で調整した Silica gel G プレート上で、クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4 by vol.) を展開溶媒として 20°C で 55 分間展開した。以下の操作は前述の TLC の時と同様に 2,7-ジクロロフルオレスセンを噴霧し、蛍光下で phosphatidylethanolamine 画分をかき出し、クロロホルム:メタノール:酢酸:水の混合液で抽出し、4 M アンモニア溶液と 50% メタノールで洗浄した。

えられたクロロホルム溶液を窒素気流下で減圧乾固し、残渣を抗酸化剤としてブチルヒドロキソトルエン (10 mg/ℓ) を含むクロロホルム溶液に溶解して、一定量とし酵素活性の測定に用いた。

4. 酵素活性の測定

一定量の ^{32}P -phosphatidylethanolamine を窒素気流下で乾固し、残渣に 0.1 M トリス—マレイン酸緩衝液 (pH 7.2) を加え、Branson Sonifier (Model W 185) にて、35 Watts, 10 分間、0°C で超音波処理し、リン脂質を緩衝液中に分散させた。

この液を 0.5 ml ないし 1 ml (1.3~2.3 μ moles 脂質—リン量) を水解反応 1 検体の基質として用いた。この基質液に酵素材料として前述の小腸両層ホモジネートを加え、全量で 2 ml の反応液とした。反応は standard な条件下で

は 37°C, 30 分間振盪しながらインキュベーションによりおこなった. 一定時間後 7.5 ml のクロロホルム:メタノール (1:2 v/v) を加えて反応を終了させた. 次いで Bligh と Dyer の方法¹⁴⁾ により前述の反応液から脂質を抽出精製し, 遠心によって上層 (水-メタノール層) と下層 (クロロホルム層) とに分離した.

上層を一定量としその一部で ³²P-標識—水溶性生成物の放射能を測定した.

下層も一定量としその一部を窒素気流下に乾固し, 前記のごとく 1 mM 炭酸ソーダで調整した活性化 Silica gel H プレート上にスポットし, クロロホルム:メタノール:酢酸:水 (100:60:14:4 by vol.) で展開して, 生成された ³²P-lysophosphatidylethanolamine と未水解の ³²P-phosphatidylethanolamine に分離し, それぞれを抽出してその放射能を測定した.

これらの ³²P-標識物質の放射能値と基質として用いた ³²P-phosphatidylethanolamine の比放射活性値から, 生成された ³²P-lysophosphatidylethanolamine および ³²P-標識—水溶性生成物, または未水解の ³²P-phosphatidylethanolamine の脂質—リン量を算出した.

水解活性は基質として加えた ³²P-phosphatidylethanolamine の放射能値に対して生成された ³²P-lysophosphatidylethanolamine, ³²P-標識—水溶性生成物, あるいは未水解の ³²P-phosphatidylethanolamine の放射能値をパーセントとして表わすか, あるいは水解された基質の脂質—リン量 (μ moles)/30 分/mg タンパク質と, および生成された lysophosphatidylethanolamine の脂質—リン量 (μ moles)/30 分/mg タンパク質と生成された水溶性生成物のリン量 (μ moles)/30 分/mg タンパク質で表わした. なおこの反応系において, 上述の 3 つの分画以外には放射能を認めなかった.

また各々の実験で盲検として酵素材料を加えずにインキュベーションを行い, その盲検値による補正をして, その値を実験結果に示した. 盲検値は lysophosphatidylethanolamine が 1.1~3.4%, 平均 1.5%, 水溶性生成物が 0.5~1.7%, 平均 0.6% であった. また反応系に加えた酵素材料に内在する phosphatidylethanolamine 量は約 0.5 μ g 脂質—リン量 (総リン脂質の約 20% として) であった.

5. Mild acid hydrolysis および mild alkaline hydrolysis

水解反応後抽出し, 前記の如く上層と下層とに分離し, 下層を TLC により lysophosphatidylethanolamine と未水解の phosphatidylethanolamine に分離する. 未水解の phosphatidylethanolamine の一部を緩やかな酸およびアルカリ水解に供した. すなわち mild acid hydrolysis

は坂上と笠間の方法¹⁵⁾ にもとづき, phosphatidylethanolamine を窒素気流下に減圧乾固し, 0.5 ml の 90% 酢酸を加え 55°C, 45 分間振盪しながら水解後, 直ちに氷冷を行った. その後窒素気流下で蒸発乾固し, クロロホルム液として TLC に供し, acid stable (diacyl 型+alkyl-acyl 型) 画分と acid labile (alkenyl-acyl 型) 画分とに分離した. さらに acid stable 画分は抽出後 Dawson の方法¹⁶⁾ により, mild alkaline hydrolysis を行い, 水層 (diacyl 型) と有機溶媒層 (alkyl-acyl 型) に分離した.

6. タンパク質量, 脂質—リン量および放射能の測定

タンパク質量の測定は Lowry らの方法¹⁷⁾, 脂質—リン量の定量は Bartlett の方法¹⁸⁾, 放射能は Geiger-Müller counter (Aloka TDC-1 型, 日本無線 Co.) でそれぞれ測定した.

実験結果

1. 酵素濃度の影響

平滑筋ホモジネートを酵素材料として用いた場合には, 2 ml の反応液中でタンパク質量として 1 mg まで phosphatidylethanolamine はほぼ直線的に水解されて減少した. タンパク質量 1 mg に相当する平滑筋層ホモジネートで水解したとき, 加えた phosphatidylethanolamine の約

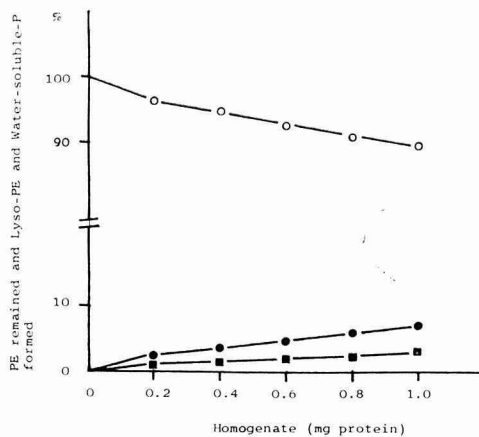


Fig. 1 Effect of amount of small intestinal smooth muscular homogenate on phosphatidylethanolamine hydrolysis.

1.5 μ moles of ³²P-phosphatidylethanolamine were used as substrate. Other incubation conditions were the same as described in Method except that the indicated amount of the smooth muscular homogenate was added into each incubation mixture.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

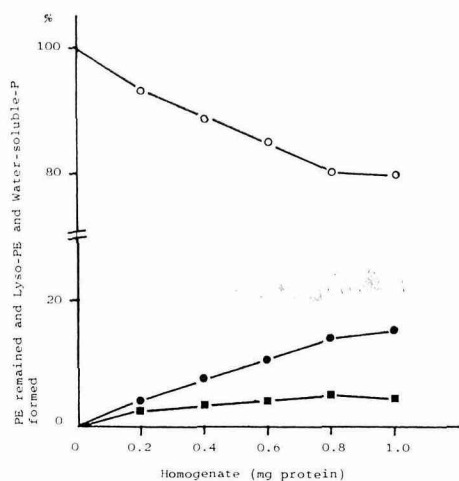


Fig. 2 Effect of amount of small intestinal mucosal homogenate on phosphatidylethanolamine hydrolysis.

Incubation conditions were the same as in Fig. 1 except that the mucosal homogenate was added as enzyme source.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

10%が水解された。一方水解産物である lysophosphatidylethanolamine と水溶性リン化合物はいずれも平滑筋層ホモジネート 1 mg まではほぼ直線的に増加し、その範囲のホモジネート量は常に水溶性リン化合物の量が lysophosphatidylethanolamine のそれを上まわった。(Fig. 1)

粘膜層でも添加したホモジネートがタンパク質量として 0~0.8 mg までの範囲で、酵素活性は酵素液タンパク質量にほぼ比例し、0.8 mg 添加時では約 20% の基質が水解された。しかしホモジネートの添加が 0.8 mg 以上になると水解度は必ずしも直線的に進行しないことが見出された。(Fig. 2) Lysophosphatidylethanolamine と水溶性リン化合物も 0.8 mg タンパク質量まで、いずれもほぼ直線的に増加した。また水溶液リン化合物の量が lysophosphatidylethanolamine のそれより常に大であった。Fig. 1 と Fig. 2 より小腸平滑筋の水解活性と粘膜層のそれと比較すると、粘膜層が平滑筋のそれより約 2 倍活性が高いことが見出された。なお以後の実験においては活性測定条件下で酵素活性が直線的に増加する範囲のタンパク質量を使用した。

2. 経時変化

Fig. 3 は平滑筋ホモジネートを用いて、各水解時間における水解された基質と生成された水解生成物をリン量 (μ moles/mg タンパク質) で示した。インキュベーション

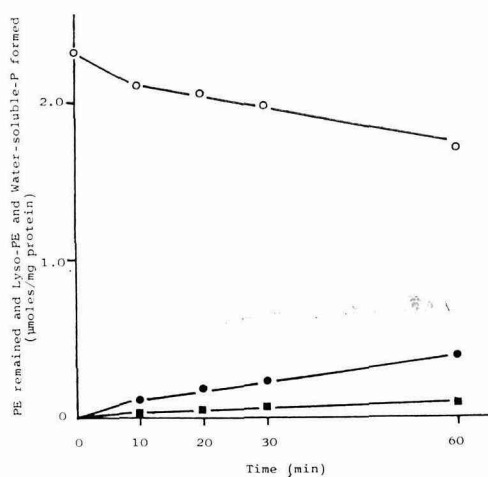


Fig. 3 Time course of phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular homogenate.

2.1 μ moles of 32 P-phosphatidylethanolamine were used as substrate. 0.8 mg protein of the smooth muscular homogenate was added into incubation mixture as enzyme source. Other incubation conditions were the same as described in Method except that each mixture was incubated for the indicated time.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

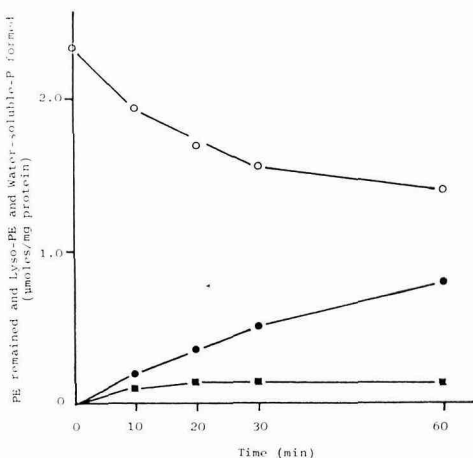


Fig. 4 Time course of phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal mucosal homogenate.

Incubation conditions were the same as in Fig. 3 except that 0.8 mg protein of the mucosal homogenate was added as enzyme source.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

時間 60 分まで phosphatidylethanolamine はほぼ直線的に水解され、その範囲では lysophosphatidylethanolamine および水溶性リン酸化合物もほぼ直線的に生成されて増加した。またどの時点においても水溶性リン酸化合物が lysophosphatidylethanolamine の生成量より多かった。

粘膜ホモジネートを用いた際基質はインキュベーション時間約 30 分までほぼ直線的に水解されるが、それ以後になると水解は必ずしも直線的ではなくなった。(Fig. 4)

水溶性リン酸化合物は 30 分まで、時間とともにほぼ直線的に増加しているが、lysophosphatidylethanolamine は 20 分までやや増加の傾向にあるが、以後の時点では変化は認められない。また Fig. 3 と Fig. 4 からこの場合も粘膜層が平滑筋層より約 2 倍水解活性が高いことが知られた。

3. pH の影響

Fig. 5 は平滑筋ホモジネートを用いて、種々の pH で生成される lysophosphatidylethanolamine と水溶性リン酸化合物 および未水解の phosphatidylethanolamine を百分率で示した。盲検(酵素材料を加えない反応)では水溶性リン酸化合物が 0.7%, lysophosphatidylethanolamine が 3.4% であったが、Fig. 5 では盲検値による補正をしないで実測値で示した。Phosphatidylethanolamine の水解

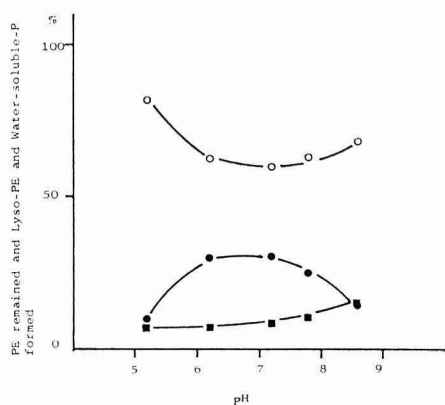


Fig. 5 Effect of pH on phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular homogenate.

1.8 μ moles of 32 P-phosphatidylethanolamine and 1 mg protein of the smooth muscular homogenate were added into each incubation mixture. The incubation mixtures contained 5 mM CaCl_2 . Other incubation conditions were the same as described in Method except that Tris-maleate buffer of the indicated pH was used for each incubation.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

は pH の変化によりことなり、pH 5.2 から pH 8.6 の範囲では pH 7.2 のところで最も水解される。しかし pH 5.2 と pH 8.6 でも比較的水解活性が見られ、pH 7.2 における phosphatidylethanolamine 水解量を 100 として pH 5.2 でその 45.6%, pH 8.6 で 79% の水解活性が認められた。Lysophosphatidylethanolamine はアルカリ側になるにつれて生成が多少漸増する傾向が観察された。

水溶性リン酸化合物の量は pH 7.2 のところで最も増大するが、pH 6.2 でもかなりの増量を来すことが知られた。同様の結果が粘膜でも観察された。

4. 基質濃度の影響

Fig. 6 には基質濃度を変えた時の水解生成物量 (lysophosphatidylethanolamine と水溶性リン酸化合物) をリン量 (μ moles) 30 分/mg タンパク質で示した。

基質量が増加すると、水解生成物もそれに対応して増加する。

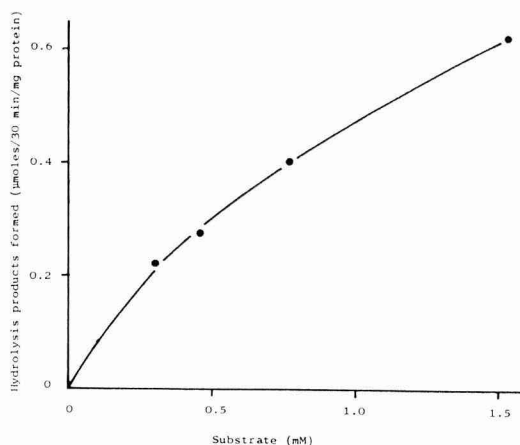


Fig. 6 Effect of substrate concentration on phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular homogenate.

1 mg protein of the smooth muscular homogenate was added as enzyme source. Other incubation conditions were the same as described in Method except that the indicated concentration of phosphatidylethanolamine was added into each incubation mixture.

5. 酵素の耐熱性

Fig. 7 は平滑筋ホモジネートを異なる温度でそれぞれ 10 分間ブレインキュベーションした後、37°C 30 分間反応させて生成された lysophosphatidylethanolamine、水溶性リン酸化合物および未水解の phosphatidylethanolamine をパーセントで示した。Lysophosphatidylethanolamine はブレインキュベーションの温度を 40°C から 50°C へと高

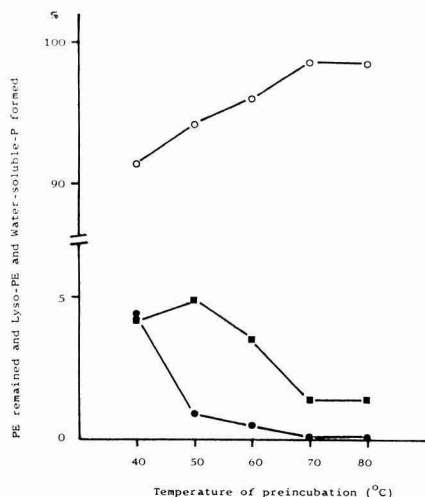


Fig. 7 Effect of preincubation of small intestinal smooth muscular homogenate on phosphatidylethanolamine hydrolysis.

2.2 μ moles of 32 P-phosphatidylethanolamine were used as substrate. The smooth muscular homogenate in 0.25 M sucrose was preincubated at the indicated temperature for ten minutes. 0.8 mg protein of preincubated homogenates were used for each incubation. Other incubation conditions were the same as described in Method.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

めると生成がそれぞれ 4.2% から 4.9% と多少増加の傾向を示し、以後は漸減し、70°C から 80°C になっても多少の生成が見られた。

水溶性リン酸化合物は 40°C から 50°C になると、急激に生成が減少し、70°C ではほとんど生成されなかった。基質は対照的に温度が高くなると未水解のものが多くなった。以上のことは粘膜でも同様の傾向を示した。

6. デオキシコール酸塩の影響

Fig. 8 で小腸平滑筋層の phosphatidylethanolamine の水解活性に対するデオキシコール酸塩の影響を基質と水解生成物のパーセントで示した。

水溶性リン酸化合物の生成はデオキシコール酸塩を反応系に加えると、著明に阻害される。1 mM の濃度ではデオキシコール酸塩がない時の値の約 1/2 に減少し、2 mM では約 1/4 に減少した。以後デオキシコール酸塩を増すと生成は漸減する傾向を示した。一方 lysophosphatidylethanolamine は 10 mM までは加えない場合と比較して、その生成に変化がなかった。20 mM の濃度になると、多少その

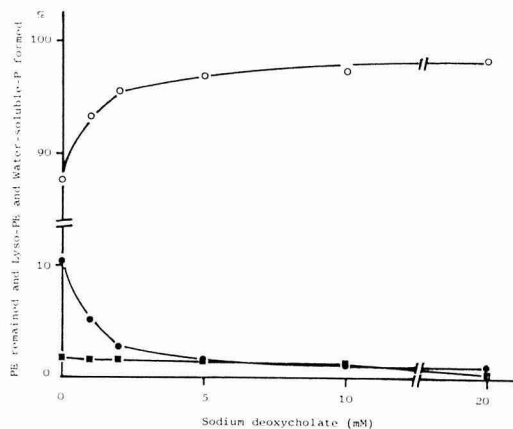


Fig. 8 Effect of deoxycholate on phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular homogenate.

2.3 μ moles of 32 P-phosphatidylethanolamine were used as substrate. 1.0 mg protein of the smooth muscular homogenate was added as enzyme source. Other incubation conditions were the same as described in Method except that the indicated amount of sodium deoxycholate was added into each incubation mixture.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

生成が減少した。この傾向は粘膜でもほぼ同様であった。

7. Ca イオン、Mg イオンの影響

Fig. 9 および Fig. 10 は phosphatidylethanolamine 水解における Ca イオン、Mg イオンの影響を lysophosphatidylethanolamine、水溶性リン酸化合物および未水解の基質を 3 者のパーセントで示した。

Ca イオンの添加では 2~10 mM の範囲で水溶性リン酸化合物の増加が見られる。2 mM の濃度では約 3 倍の増加をみるが、3 mM では 2 mM のときより多少減少し、以後 Ca イオンが増えても生成に大きな変化が観察されなかった。Lysophosphatidylethanolamine は Ca イオン添加により変化はみられなかった。

反応系に Mg イオンを加えたときも Ca イオン程ではないが、水解は促進される傾向が観察された。(Fig. 10) Mg イオンが 2 mM の濃度で水溶性リン酸化合物は 1.3 倍の増加がみられ、以後は生成が漸減し、5 mM 以上ではその生成に変化がなかった。Lysophosphatidylethanolamine は Mg イオンを加えると多少生成が減少する傾向を示した。Phosphatidylethanolamine 水解における Ca イオン、Mg イオンの影響は粘膜層についても同様であった。

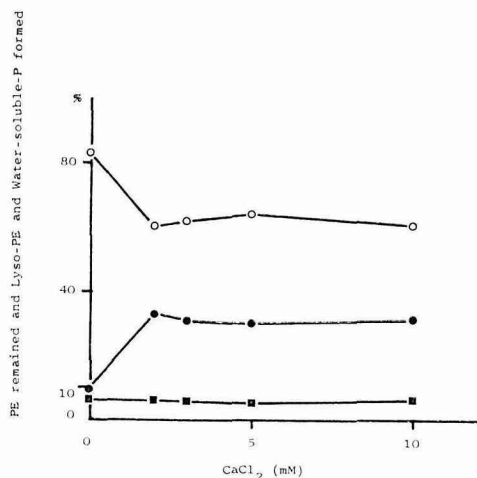


Fig. 9 Effect of Ca^{2+} on phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular homogenate.

1.3 μ moles of ^{32}P -phosphatidylethanolamine were used as substrate. 0.8 mg protein of the smooth muscular homogenate was added as enzyme source. Other incubation conditions were the same as described in Method except that the indicated amount of CaCl_2 were added into each incubation mixture.

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

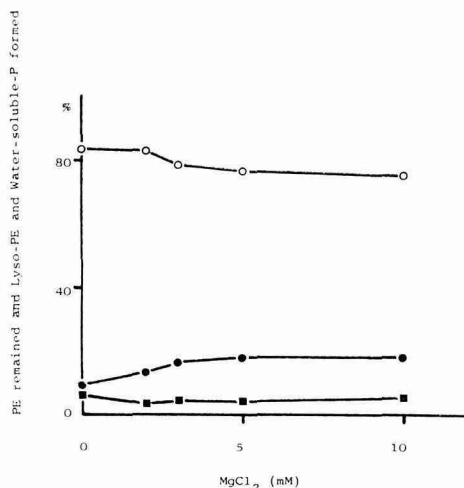


Fig. 10 Effect of Mg^{2+} on phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular homogenate.

Incubation conditions were the same as in Fig. 9 except that MgCl_2 was added in place of CaCl_2

- phosphatidylethanolamine (PE)
- lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE)
- water-soluble products (Water-soluble-P)

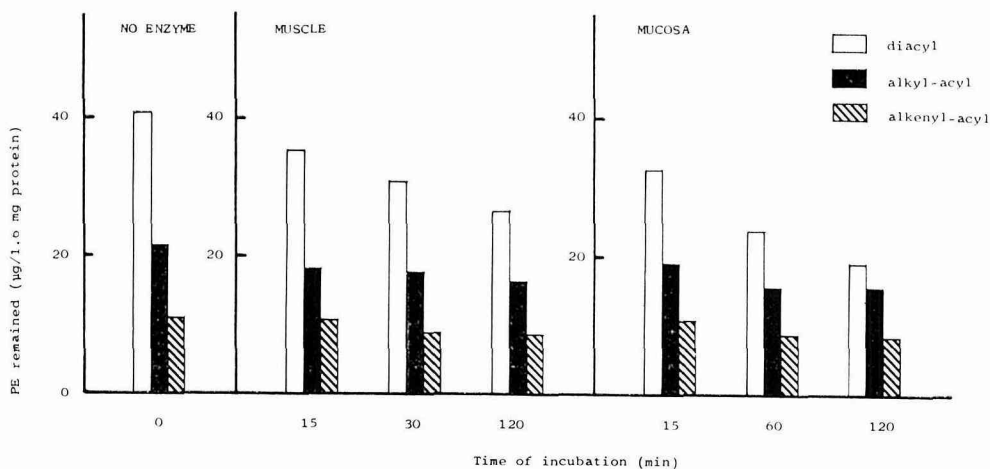


Fig. 11 Time course of diacyl, alkyl-acyl and alkenyl-acyl phosphatidylethanolamine hydrolysis by small intestinal smooth muscular or mucosal homogenate.

85.0 μg of lipid-phosphorus of ^{32}P -phosphatidylethanolamine were used as substrate. 1.6 mg protein of the smooth muscular or mucosal homogenate was added as enzyme source. The mixture was incubated for the indicated time. ^{32}P -phosphatidylethanolamine isolated from each incubation mixture and subjected to mild acid hydrolysis was followed by mild alkaline hydrolysis. See details in Method.

8. Diacyl 型, alkyl-acyl 型, alkenyl-acyl 型的水解

Fig. 11 は小腸両層とインキュベーション後、反応系から未水解の phosphatidylethanolamine を分離し、緩和专业およびアルカリ分解することにより diacyl 型, alkyl-acyl 型, alkenyl-acyl 型 phosphatidylethanolamine に分離し、それぞれを脂質—リン量 (μg)/1.6 mg タンパク質で示した。

インキュベーション前、基質として加えた phosphatidylethanolamine の三者の割合は diacyl 型 54.8%, alkyl-acyl 型 28.6%, alkenyl-acyl 型 16.6% で、それらの比放射活性値 (cpm/ μg of 脂質—リン, SA) はそれぞれ 4224, 3077, 3876 と三者の間で異なる値を示し、diacyl 型が一番大きな SA を示した。

平滑筋層ではインキュベーション後、diacyl 型が 120 分まで著明に減少するが、alkyl-acyl 型, alkenyl-acyl 型的水解は少なかった。

粘膜層でも同様の傾向を認めた。すなわち diacyl 型は著明に減少し、alkyl-acyl 型, alkenyl-acyl 型的水解は筋層同様わずかであった。

以上の様に小腸両層のインキュベーションによる phosphatidylethanolamine の水解は diacyl 型が活発で、alkyl-acyl 型と alkenyl-acyl 型ではその水解に大きな差は認められなかった。

考 察

動物組織における phospholipase の存在については膵¹⁹⁾、肝^{20~28)}、肺²⁹⁾、脳³⁰⁾、心³¹⁾、脾³²⁾、血管³³⁾、骨格筋⁴⁾、副腎³⁴⁾ で多くの報告がなされている。小腸においては 1957 年 Schmidt ら¹⁾ が粘膜、主としてそのミトコンドリア画分、を材料として phospholipase 活性の存在を報告して以来、小腸全体あるいは粘膜についての研究が行われ、膵について phospholipase 活性の強いことが知られた。

一方小腸平滑筋に関しては本酵素の研究は少なくしかも lecithin に関するものがほとんどで phosphatidylethanolamine については極めて僅かな報告が見られるに過ぎない。

工藤⁹⁾、井村¹⁰⁾ は *in vitro* でラット小腸平滑筋層をインキュベートして phosphatidylethanolamine の減少を認めこのリン脂質の水解を行う酵素の存在を示した。しかし小腸より精製した phosphatidylethanolamine を基質として小腸ホモジネートによりその分解様式およびその特性を検討した研究は今までなされていない。

小腸は粘膜層と平滑筋層よりなり、消化と吸収という生理作用を営んでいるが Marples と Thompson³⁾ はラット小腸全体で、その lysophospholipase 活性を検討し、そ

の活性はほとんど粘膜層に由来すると述べている。しかし前述のごとく工藤、井村が小腸粘膜のみならず、平滑筋層にも内在するリン脂質を水解する phospholipase 活性および lysophospholipase 活性の存在を示唆する結果を報告し、また近藤¹¹⁾ も lecithin, lysolecithin を基質として、小腸平滑筋層の水解活性を粘膜層と比較して、粘膜層の方が活性が大きい平滑筋層にも明らかな活性を見出し、また lysophospholipase の比活性が lecithin 水解の比活性より著明に大きかったと述べている。

小腸両層ホモジネートを酵素材料とし、基質として phosphatidylethanolamine を加えた本実験において、粘膜層のみならず平滑筋層でも phosphatidylethanolamine を水解する活性の存在が示された。

小腸両層における phosphatidylethanolamine 水解酵素の活性を比較すると、粘膜層が平滑筋層より活性が高く、Fig. 1 と Fig. 2 から粘膜層の活性が平滑筋のそれより約 2 倍高い水解活性を示した。

近藤¹¹⁾ は lecithin の水解時に粘膜のみならず、平滑筋層においても lysophospholipase 活性が強く、lysolecithin の増大は認められず、水解生成物はほとんど水溶性リン酸化合物として回収されると述べている。しかし phosphatidylethanolamine の水解時にはリゾ体もやや増加することが知られ、平滑筋層ではタンパク質量 1 mg まで、またインキュベーション 60 分まで lysophosphatidylethanolamine がほぼ直線的に増加するのが観察された。(Fig. 1, Fig. 3)

小腸両層における著者の phosphatidylethanolamine による結果と近藤の lecithin による結果と比較してみると、phosphatidylethanolamine を水解する活性が平滑筋で約 30 倍、粘膜層で約 50 倍 lecithin のそれより高い。この事実は Bjørnstad²²⁾ がラット肝ミトコンドリアを用いて、また Smith と Winkler³⁴⁾ が牛副腎髓質のリソゾームを用いてえた結果と近似する。井村¹⁰⁾ も小腸両層をインキュベーションした際 60 分まで phosphatidylethanolamine が lecithin より水解の程度が大きいと述べている。

Ottolenghi⁵⁾、Epstein と Shapiro ら²⁾ が lecithin を基質としラット小腸粘膜を酵素材料として行なった実験結果から、小腸粘膜では lysophospholipase 活性が強いため、phospholipase A で生じた lysolecithin が直ちに水解されてしまうと報告している。Phosphatidylethanolamine の水解においても、小腸粘膜ではリゾ体を水解する活性が強いため lysophosphatidylethanolamine の著明な増加がみられないと考えられる。

小腸平滑筋ホモジネートによる phosphatidylethanolamine の水解は pH 7.2 のところで最も強く、粘膜層でも

同様の傾向を示した。Scherphof ら²⁰⁾ はラット肝ミトコンドリアを用いて、その phospholipase A 活性は pH 8 を最高として比較的幅広い範囲にあると述べ、Nachbaur ら²⁸⁾ はラット肝ミトコンドリアおよびミクロソームなどの膜結合性 phospholipase は pH 8.5~9.0 に至適 pH があり、可溶性の phospholipase はリソゾームにあり、pH 4.5 に活性が強いと報告している。また Rahman ら²⁶⁾ はラット肝リソゾームの膜画分は Ca イオン添加により pH 7~8 に強い活性があると報告している。本実験においても 5 mM の CaCl_2 を添加して、pH 7.2 のところで最も水解活性が高い結果を得た。生成物は水溶性リン酸化合物が pH 7.2 のところで最も増加し、lysophosphatidylethanolamine がアルカリ側で増加の傾向を示している。

小腸平滑筋層を 40°C から 80°C までそれぞれ異なる温度で熱処理を加えた後、インキュベートすると、phosphatidylethanolamine の水解はブレインキュベーションの温度の増加とともに減少し、特に水溶性リン酸化合物の著明な減少を示した。(Fig. 7) Cooper と Webster³⁰⁾ は動物組織の脳の lysophospholipase は熱に不安定であると述べており、Bjørnstad²²⁾ もラット肝ミトコンドリアの phospholipase は 60°C、10 分間のブレインキュベーションでほとんど活性を失うと報告している。一方 Mellors と Tappel²⁴⁾ はラット肝リソゾームの phospholipase A は熱に抵抗性があるとし、Waite ら²¹⁾ はラット肝ホモジネートを用いて、55~65°C、5 分間のブレインキュベーションで phospholipase A 活性が逆に高まると報告している。著者の小腸両層でえられた結果でも 50°C、10 分間処理時にやや活性が増すことが観察された。

反応系にデオキシコール酸塩を加えた時、平滑筋層でも粘膜層と同様に、デオキシコール酸塩の増加とともに phosphatidylethanolamine の水解が減少した。(Fig. 8) 特に水溶性リン酸化合物の生成が著明に減少するが lecithin の水解時と異なりリゾ体の増量がみられず、phosphatidylethanolamine 水解酵素に対するデオキシコール酸塩の影響は lecithin のそれと異なることが知られる。

Subbaiah と Ganguly⁸⁾ は小腸粘膜の lysophospholipase 活性と phosphatidylethanolamine 水解活性はデオキシコール酸塩により阻害されるが、lecithin 水解時の phospholipase 活性に対しては影響せず、その量を増すと逆に活性を促進すると述べている。近藤¹¹⁾ もデオキシコール酸塩により lecithin の水解が増加する一方、その濃度を増すと lysolecithin が増加し、1 mM と 5 mM の濃度で水溶性リン酸化合物が二峰性のピークを示す結果を報告した。Phosphatidylethanolamine の水解では Ohta と Hasegawa²⁹⁾ もラット肺でデオキシコール酸塩が lyso-

phospholipase のみならず phospholipase A にも阻害効果があると報告している。

Lecithin の phospholipase に対してデオキシコール酸塩は活性を促進させ、phosphatidylethanolamine のそれには阻害するという結果は phospholipase 活性がそれぞれの基質において異なる特性を示すこととなり phosphatidylethanolamine と lecithin の phospholipase が同一酵素ではないことを推測させる興味のある知見である。また小腸両層のデオキシコール酸塩による phosphatidylethanolamine 水解の阻害は基質レベルにあるか、酵素レベルにあって失活するのかということも問題となり、今後の検討が必要である。

Phosphatidylethanolamine の水解に際し、小腸両層とも Ca イオンの添加は明らかな水解促進効果を示した。それは水溶性リン酸化合物の増加として認められたがリゾ体の増減はほとんど示されなかった。(Fig. 9)

一方近藤¹¹⁾ が lecithin を基質として用いた実験では Ca イオンを加えても、ほとんど水解には影響を与えず、平滑筋層では lysophospholipase 活性は逆にわずかながら阻害される結果を得ている。Subbaiah と Ganguly⁸⁾ は lecithin を基質として、Ca イオンが粘膜層の phospholipase A 活性と lysophospholipase 活性を僅かに促進するが、遊離脂肪酸が存在すると phospholipase B 活性を阻害すると述べている。

その他 phospholipase に対する Ca イオンの影響は肺²⁹⁾、肝^{22~28)} などで見られ、Bjørnstad^{22,23)} はラット肝ミトコンドリアおよびミクロソームで Ca イオンが phosphatidylethanolamine phospholipase に促進的に作用することを報告している。これに対して Franson ら²⁷⁾ はラット肝リソゾームの可溶画分を酵素材料とし、phosphatidylethanolamine を基質として Ca イオンは阻害的に作用すると報告している。このように phospholipase に対する Ca イオンの影響は基質の相異によっても、また細胞内オルガネラによっても一様ではないことが知られる。

他方 Mg イオンは phosphatidylethanolamine 水解においてその水解を軽度促進させ、水溶性リン酸化合物は多少増加の傾向を示したが、lysophosphatidylethanolamine の生成は僅かに減少した。(Fig. 10) Bjørnstad²³⁾ は phosphatidylethanolamine を基質として肝のミクロソームで Mg イオンは 5 mM の濃度で Ca イオン程でないが、水解活性を促進すると述べている。しかし Waite ら²⁵⁾ はラット肝ミトコンドリアで Mg イオンは阻害的に作用することを報告している。小腸における phospholipase 活性の Ca イオン、Mg イオンの影響も個々の細胞内オルガネラについての検索が必要であろう。

なお著者の実験で酵素材料として使用した小腸両層に内在する Ca イオンの影響については近藤¹¹⁾が 7 mg の小腸両層ホモジネートを使用しても内在する Ca イオンの影響は軽微であると報告しているが、著者の実験では内在性の Ca イオンが明らかでないが、酵素材料は極めて僅かであったことから一応顧慮する必要がないと思われる。

小腸両層の phosphatidylethanolamine の α 位は alkyl 型, alkenyl 型が比較的多い。このことは山田¹²⁾がラット小腸平滑筋層の phosphatidylethanolamine において diacyl 型 47.6%, alkenyl 型 40.0%, alkyl 型 12.5%, 粘膜層では diacyl 型 58.6%, alkenyl 型 14.2%, alkyl 型 28.0% と報告している。井村¹⁰⁾もほぼ同様の結果を報告しているが、本実験において基質として調整した phosphatidylethanolamine の三者の割合は平滑筋層と粘膜層を分離しないで一括して抽出分離したものであるため、それぞれ diacyl 型 54.8%, alkyl 型 28.6%, alkenyl 型 16.6% であった。また本実験において三者の間で比放射活性 (cpm/ μ g of lipid-P) がそれぞれ異なり、diacyl 型 4224, alkyl 型 3077, alkenyl 型 3876 と diacyl 型の比放射能 (SA) が最も高い値を示した。

斎藤³⁵⁾は頸静脈から ^{32}P i を注入し、6 時間までの acid stable (diacyl+alkyl) と acid labile (alkenyl) に分けて、その SA から ^{32}P i の取込みを見ているが、小腸両層において acid stable が acid labile より SA が大きいと報告している。これは本実験の結果とも一致するが、Horrocks³⁶⁾の [1,2- ^{14}C] ethanolamine のラット脳 phosphatidylethanolamine 画分への取込みを見た実験では注射後、短時間では alkenyl 型の SA は diacyl 型, alkyl 型のそれより低かった。Waku³⁷⁾も ^{32}P i, ^3H -acetate を使ってウサギ骨格筋小胞体の phosphatidylethanolamine 画分への取込みをみた実験から同様の傾向を報告している。しかし Thompson³⁸⁾はナメタジの一種である Arion arter を用いて [1- ^{14}C] palmitic acid や ^3H -chymyl alcohol の取込みをみた実験で、phosphatidylethanolamine 画分において diacyl 型や alkyl 型よりはるかに低かった alkenyl 型の SA が 2 日あるいはそれ以上の時点では alkyl 型と同程度まで増加したことを報告している。著者の結果も ^{32}P i をラット腹腔内に注入して 22~24 時間を経た時点の SA であるため、上述の結果とほぼ同じ傾向を示した。

次に diacyl 型, alkyl 型, alkenyl 型の三者の水解については井村¹⁰⁾が小腸両層をインキュベートすることにより組織片に内在する phosphatidylethanolamine が両層とも diacyl 型が最も水解されると報告している。本実験においても水解の主体は diacyl 型である結果を得た。(Fig. 11)

Waku³⁹⁾は卵黄や牛の lecithin から合成した 1-acyl-, 1-alkyl-, 1-alkenyl-2-linoleoyl-glycerophosphorylcholine に対して種々の phospholipase を作用させて、水解の程度が異なることを報じている。

これらの水解の程度が 3 つの型で異なるというのは非常に興味のある知見で、この差が α 位の違いによる phospholipase A₁ の違いによるものか、また α 位を切断する lysophospholipase は同一酵素でなく、それぞれの酵素をもち、その活性が種々の条件によって異なるかは今後の研究をまたねばならない。また小腸の phosphatidylethanolamine phospholipase の細胞内分布についても未だ解明されていないことも多い。

小腸の平滑筋層のリン脂質代謝についていくつかの新しい知見を得たが、なおその機能との関連で今後さらに研究が必要であろう。

要 約

ラット小腸平滑筋層における phosphatidylethanolamine の酵素的な水解を粘膜層のそれと対比して検討した。水解活性はラット小腸より分離した ^{32}P -phosphatidylethanolamine を基質とし、平滑筋層または粘膜層の 700×g ホモジネートを酵素材料として用い、0.1 M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で、37°C でインキュベートすることにより水解活性を測定した。

1) 小腸平滑筋層にも粘膜層と同様に phosphatidylethanolamine を水解する活性が見出され、その活性は粘膜層のその約 43~45% の活性であった。

2) 平滑筋層における最適 pH は 7.2 で粘膜層も同様の結果を示した。

3) 平滑筋層の phosphatidylethanolamine の水解活性は酵素材料をブレインキュベーションした際、温度の上昇とともに阻害され、なかでも水溶性リン酸化合物の生成は著明に阻害された。粘膜層も同じ傾向を示した。

4) 小腸両層による phosphatidylethanolamine の水解はデオキシコール酸塩により活性が阻害された。とくに水溶性リン酸化合物の生成が著明に阻害され、大量のデオキシコール酸塩の存在下ではリゾ体の生成も阻害された。

5) 小腸両層の Ca イオンおよび Mg イオンの影響では Ca イオンは phosphatidylethanolamine の水解を促進し、とくに水溶性リン酸化合物の生成を増加せしめた。Mg イオンは軽度水解を促進させた。

6) Phosphatidylethanolamine 画分の水解の程度を diacyl 型, alkyl-acyl 型, alkenyl-acyl 型の三者で比較したところ、小腸両層で diacyl 型の水解が他の二者より極めて強いことが認められた。Alkyl-acyl 型と alkenyl-acyl 型ではほぼ同程度水解されることが知られた。

(昭和 51. 12. 20 受付)

References

- 1) Schmidt, G., Bessman, M. J. and Thannhauser, S. J.: Enzymic hydrolysis of cephalin in rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 127-138 (1957).
- 2) Epstein, B. and Shapiro, B.: Lecithinase and lysolecithinase of intestinal mucosa. *Biochem. J.* **71**, 615-619 (1959).
- 3) Marples, E. A. and Thompson, R. H. S.: The distribution of phospholipase B in mammalian tissues. *Biochem. J.* **74**, 123-127 (1960).
- 4) Gallai-Hatchard, J. J. and Thompson, R. H. S.: Phospholipase A activity of mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 128-136 (1965).
- 5) Ottolenghi, A.: Estimation and subcellular distribution of lecithinase activity in rat intestinal mucosa. *J. Lipid Res.* **5**, 532-537 (1964).
- 6) Ottolenghi, A.: Preparation and characterization of mouse intestinal phospholipase. *Lipids* **8**, 415-425 (1973).
- 7) Robertson, A. F.: Lecithinase and lysolecithinase activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 379-381 (1966).
- 8) Sabbaiah, P. V. and Ganguly, J.: Studies on the phospholipases of rat intestinal mucosa. *Biochem. J.* **118**, 233-239 (1970).
- 9) 工藤信夫: ラット小腸平滑筋のリン脂質の分解に関する研究. 札幌医誌 **43**, 1-13 (1974).
- 10) 井村勝之: 小腸平滑筋のリン脂質代謝に関する研究. ラット小腸平滑筋におけるリン脂質の *in vitro* での合成, 分解について. 札幌医誌 **44**, 239-251 (1975).
- 11) 近藤益夫: ラット小腸平滑筋における lecithin および lysolecithin の水解に関する研究. 札幌医誌 **44**, 185-199 (1976).
- 12) 山田恵子: ラット小腸筋層および粘膜層の diacyl, alkenyl-acyl, alkyl-acyl glycerylphosphorylethanolamine および -choline について. 札幌医誌 **43**, 269-277 (1974).
- 13) Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).
- 14) Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
- 15) 坂上利夫, 笠間将榮: Plasmalogen (acetal phospholipid) 微量定量法. 生化学 **28**, 712-713 (1957).
- 16) Dowson, R. M. C.: A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. *Biochem. J.* **75**, 45-53 (1960).
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 18) Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959).
- 19) Van Den Bosch, H., Aarsman, A. J. and Van Deenen, L. L. M.: Isolation and properties of a phospholipase A₁ activity from beef pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **348**, 197-209 (1974).
- 20) Scherphof, G. L. and Van Deenen, L. L. M.: Phospholipase A activity of rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 204-206 (1965).
- 21) Waite, M. and Van Deenen, L. L. M.: Hydrolysis of phospholipids and glycerides by rat-liver preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 498-517 (1967).
- 22) Bjørnstad, P.: Phospholipase activity in rat liver mitochondria studied by the use of endogenous substrates. *J. Lipid Res.* **7**, 612-620 (1966).
- 23) Bjørnstad, P.: Phospholipase activity in rat-liver microsomes studied by the use of endogeneous substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 500-510 (1966).
- 24) Mellors, A. and Tappel, A. L.: Hydrolysis of phospholipids by a lysosomal enzyme. *J. Lipid Res.* **8**, 479-485 (1967).
- 25) Waite, M., Scherphof, G. L., Boshouwers, F. M. G. and Van Deenen, L. L. M.: Differentiation of phospholipases A in mitochondria and lysosomes of rat liver. *J. Lipid Res.* **10**, 411-420 (1969).
- 26) Rahman, Y. E., Verhagen, J. and Wiel, D. F. M.: Evidence of a membrane-bound phospholipase A in rat liver lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 670-677 (1970).
- 27) Franson, R., Waite, M. and Lavia, M.: Identification of phospholipase A₁ and A₂ in the soluble fraction of rat liver lysosomes. *Biochemistry* **10**, 1942-1946 (1971).
- 28) Nachbaur, J., Colbeau, A. and Vignais, P. M.: Distribution of membrane-confined phospholipase A in the rat hepatocyte. *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 426-446 (1972).
- 29) Ohta, M. and Hasegawa, H.: Phospholipase A activity in rat lung. *Tohoku J. Exp. Med.* **108**, 85-94 (1972).

- 30) Cooper, M. F. and Webster, G. R.: The differentiation of phospholipase A₁ and A₂ in rat and human nervous tissues. *J. Neurochem.* **17**, 1543-1554 (1970).
- 31) Weglicki, W. B., Waite, M., Sisson, P. and Shohet, S. B.: Myocardial phospholipase A of microsomal and mitochondrial fractions. *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 512-519 (1971).
- 32) Lloveras, J. and Blazy, L. D.: Hydrolysis of [³H, ¹⁴C] phosphatidylethanolamines by acid phospholipases A of subcellular fractions of rat spleen. *Eur. J. Biochem.* **33**, 567-577 (1973).
- 33) Eisenberg, S., Stein, Y. and Stein, O.: Phospholipases in arterial tissue. II. Phosphatide acyl-hydrolase and lysophosphatide acyl-hydrolase activity in human and rat arteries. *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 205-214 (1968).
- 34) Smith, A. D. and Winkler, H.: Lysosomal phospholipases A₁ and A₂ of bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* **108**, 867-874 (1968).
- 35) 斎藤 徹: 小腸平滑筋のリン脂質代謝に関する研究. 2. ラット小腸平滑筋の acid labile および acid stable phosphatidylethanolamine について. *札幌医誌* **42** 202-211 (1973).
- 36) Horrocks, L. A. and Ansell, G. B.: The incorporation of ethanolamine into ether-containing lipids in rat brain. *Lipids* **2**, 329-333 (1967).
- 37) Waku, K. and Nakazawa, Y.: The rates of incorporation of inorganic orthophosphate, glycerol, and acetate into phospholipids of rabbit sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* **73**, 497-504 (1973).
- 38) Thompson, Jr. G. A.: The biosynthesis of ether-containing phospholipids in the slug, *Arion* arter. II. The role of glyceryl ether lipids as plasmalogen precursors. *Biochemistry* **5**, 1290-1296 (1966).
- 39) Waku, K. and Nakazawa, Y.: Hydrolyses of 1-0-alkyl-, 1-0-alkenyl-, and 1-acyl-2-[1-¹⁴C]-linoleoyl-glycero-3-phosphorylcholine by various phospholipases. *J. Biochem.* **72**, 149-155 (1972).